N° d'ORDRE : 3

THÈSES

présentées

à la Faculté des Sciences de l'Université d'Aix - Marseille

pour obtenir

le Grade de Docteur de l'Université

par

KUNO MEZGER

PREMIÈRE THÈSE : Contribution à l'Étude de quelques Lipases.

DEUXIÈME THÈSE : Propositions données par la Faculté.

Soutenues le 1922 devant la Commission d'Examen

MM. RIVALS, Président
JOURDAN
JUMELLE } Examinateurs
MARGAILLAN

Imprimerie - Librairie FERRAN Jeune
40-42, Rue Longue-des-Capucins
MARSEILLE

1922

N° d'ORDRE : 3

THÈSES

présentées

à la Faculté des Sciences de l'Université d'Aix - Marseille

pour obtenir

le Grade de Docteur de l'Université

par

KUNO MEZGER

PREMIÈRE THÈSE : Contribution à l'Étude de quelques Lipases.

DEUXIÈME THÈSE : Propositions données par la Faculté.

Soutenues le 1922 devant la Commission d'Examen

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

MM. RIVALS, Président
JOURDAN
JUMELLE
MARGAILLAN
} Examinateurs

Imprimerie - Librairie FERRAN Jeune
40-42, Rue Longue-des-Capucins
MARSEILLE

1922

ACADÉMIE D'AIX

Faculté des Sciences de Marseille

MM.

Doyen	RIVALS	Chimie Industrielle.
Doyen honoraire	CHARVE	Mécanique rationnelle et Appliq.
Professeurs honoraires.	STEPHAN	
	PÉROT	
	CAULLERY	
	CH. FABRY	
Chargé de Cours honor^re	CHANCEL	
Professeurs.	JOURDAN	Physiologie.
	VAYSSIÈRE	Zoologie.
	HOULLEVIGUE	Physique Générale.
	JUMELLE	Botanique.
	DECROCK	Botanique Agricole.
	BUISSON	Physique.
	BERG	Chimie Générale.
	REPELIN	Géologie.
	FABRY E.	Calcul différentiel et Int.
	SÈVE	Physique Industrielle.
	PÉRÈS	Mécanique.
	COTTE	Zoologie Agricole.
	N...	Astronomie.
Professeurs sans chaires	J. DE CORDEMOY	Botanique.
	TIAN	Chimie.
Chargés de Cours complémentaires.	DESOUCHES	Mathématiques.
	MARGAILLAN	Electro-chimie.
	PADOVA	Chimie.
Secrétaire	ESTANAVE	

Contribution à l'Étude de quelques Lipases

AVANT-PROPOS

Avant de décrire mes recherches sur quelques lipases, qu'il me soit permis ici d'assurer M. le Doyen de la Faculté des Sciences de Marseille de ma profonde gratitude.

M'ayant permis en effet de travailler sous sa haute direction M. le Professeur P. Rivals n'a cessé de me témoigner toujours la plus grande sollicitude et le plus vif intérêt.

Je tiens à remercier très sincèrement M. le Professeur H. Jumelle de sa grande bienveillance à mon égard et de ses précieux conseils.

En voulant bien diriger mes recherches et en mettant ses collections à ma disposition, M. le Professeur H. Jumelle a été pour moi un grand appui moral et matériel pour lequel je ne saurai lui être assez reconnaissant.

Il m'est agréable d'offrir ici à M. le Professeur L. Margaillan mes plus vifs remerciements. Le grand intérêt que M. le Professeur Margaillan m'a toujours porté, les excellents avis donnés sans cesse m'ont beaucoup aidé dans mes recherches.

Je veux assurer ici M. le Chef des Travaux pratiques, M. Karl de ma reconnaissance pour son extrême obligeance, et d'avoir toujours mis les ressources de son laboratoire à ma disposition.

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE

DE

QUELQUES LIPASES

BIBLIOGRAPHIE

Dès 1855, Pelouze (*C. R.* 40-*605*, *1855*) puis plus tard en 1876 Schutzenberger (*On Fermentation-International Scientific Series*) avaient supposé, mais sans pouvoir le démontrer qu'il devait exister dans les graines oléagineuses une substance capable d'hydrolyser les huiles.

En 1890, Green (*Proc Roy. Soc.*, 48, *3*, *1890*) obtint le 1° au moyen de graines de ricin germées, un extrait ayant un pouvoir hydrolysant. Il vit aussi que si on ajoute un peu d'acide acétique dilué à des graines de ricin se trouvant à l'état de vie ralentie, on obtient un corps ayant les mêmes propriétés lipolytiques.

Depuis cette époque de très nombreux travaux ont été publiés sur cette substance qu'on appelle aujourd'hui diastase ou enzyme lipolytique, lipodiastase et lipase.

Tandis que quelques auteurs, employant des graines oléagineuses diverses, fraîches ou desséchées, dégraissées ou non au préalable, étudiaient les facteurs physiques ou chimiques qui peuvent activer, gêner ou paralyser la diastase, d'autres traitaient les diverses graines oléagineuses par différents liquides, puis par précipitation de ceux-ci au moyen d'alcool,

etc., essayaient d'obtenir des extraits. Ces préparations sèches ou liquides, sous forme de pâtes ou de poudres, devaient sous un volume minimum donner une hydrolyse maxima des huiles avec lesquelles elles étaient mises en contact.

Nous avons vu que Green obtient un extrait ayant un pouvoir lipolytique en partant de graines de ricin germées, et aussi une substance identique si à ces mêmes graines, mais non germées, il ajoute un peu d'acide acétique dilué.

A la même époque Sigmund (*Monatsh. f. Chem.* 11-272, *1890*) démontre que si on broie finement des graines non germées de lin, de navet, de ricin, de pavot, de maïs et si on les traite ensuite par de l'eau ou de la glycérine on obtient un liquide d'où l'alcool précipite une substance ayant une activité lipolytique.

Dans les *Sitz der Kais, Akad, Wissensch, Wien,* 100-328, *1891*) Sigmund décrit des expériences faites avec des graines de chanvre, de navet, de pavot qu'il faisait germer pendant 2 jours puis qu'il séchait à 35° C. En comparant les résultats avec ceux produits par ces mêmes graines mais non germées et traitées de la même façon, il constatait que l'hydrolyse produite par les graines germées est plus forte ce qui semblerait confirmer l'hypothèse de Green : dans les graines à l'état de vie ralentie la lipase existe comme zymogène qui ne deviendra enzyme qu'au moment de la germination. La présence d'acides gênerait l'hydrolyse.

En répétant ces expériences W. Connstein, E. Hoyer et H. Wartenberg (*Berl. Ber , 1902, 35 (18) p. 3988-4006*) trouvent que si avec des graines de ricin germées et avec ces mêmes graines non germées on fait durer pendant plusieurs jours les expériences, au lieu de 24 heures comme le faisait Green l'acidité provoquée par la mise en liberté des acides gras contenue dans l'huile employée et celle existant déjà dans les

graines oléagineuses augmente après une période de 2 à 6 jours, seulement si une certaine proportion d'acide est présente.

En contradiction avec Sigmund les auteurs recommandent d'ajouter un peu d'acide dilué, acide acétique ou sulfurique décinormal, acide phosphorique ou du bisulfate de soude.

H. E. Armstrong (*Roy. Soc. Proc., 1905,* 76-*606-608*) préconise l'emploi des acides glutamiques et aspartiques.

Nicloux (*Br. fr. du 14 octobre 1903*) recommandait aussi l'emploi des acides animées.

Or, dans le *Zentralblatt 1912* Bd. 2 bis, MM. Raffo et G. Pandini publient des expériences faites sur la lipase contenue dans des graines de coloquinte, pour laquelle le milieu alcalin est le plus favorable.

Le pouvoir hydrolysant de l'enzyme n'est pas influencé par l'éther ou le sulfure de carbone tandis qu'un traitement par l'eau, par la glycérine, ou par des solutions de sel minéral l'affaiblissent.

K. Bournot (*Biochem. Zeitg 1913*-52-*172-205*), recommande d'employer dans chaque expérience 20 % d'eau, calculé sur le poids de l'huile employée.

Tanaka (8th Congr. of Intern[l]. Appl. chem. - 1912), dit qu'on peut employer en H^2O, 6 à 10 fois le poids de préparation sèche de lipase dont on se sert dans l'expérience.

D'après ce même auteur les sels alcalins neutres activent la lipase du ricin, les sels de Ca - Ba - Cu seraient toxiques, tandis que les sels de manganèse activent beaucoup.

D'après J. J. Sudborough - H. Watson - P. S. Warna (*J[l] Indian Inst. Scientif. 1919* - 2 - *p. 241-265*), les graines de ricin broyées ou les préparations lipolytiques de celles-ci, sont activées d'une façon énergique par SO^4Mn, employé à la dose de 0,20 % du poids de l'huile.

Dans le *J[l] Amer. Chem. Soc.* 35 - 210 - *19th february 1913*,

George Falk et M. L. Hamlin disaient déjà au sujet du sulfate de manganèse : « le sulfate de manganèse active plus que tout autre sel, les lipases. On doit le considérer comme un porteur d'oxygène ». Il résulterait des expériences de ces auteurs que le zymogène inactif deviendrait un enzyme actif par oxydation. Dans ce but la présence d'un porteur d'oxygène c'est-à-dire d'un catalyseur est nécessaire.

Tandis que ces différents auteurs s'occupaient des conditions physiques ou chimiques optima pour l'hydrolyse, d'autres s'efforçaient de produire des solutions ou des poudres sèches ayant des propriétés lipolytiques.

I. — Préparations liquides. — En 1903, M. Nicloux prit le brevet français (*n° 335.902 du 14 octobre 1903*) suivant : des graines de ricin ou d'autres graines oléagineuses sont broyées, puis triturées avec de l'huile de ricin venue d'une opération précédente. Cet extrait huileux est filtré puis centrifugé ; le dépôt est constitué par des aleurones et par la substance qui a un pouvoir lipolytique.

Le 15 Septembre 1904, E. Urbain (*Br. fr. n° 350.119*), obtient une préparation très active en triturant le tourteau de ricin avec son poids d'eau, il laisse le mélange subir une hydrolyse protéolytique à 40°, il filtre après 8 jours, et dans l'hydrolyse des huiles il remplace l'eau par ce filtrat.

En 1905, F. Dunlap et W. Seymour (*J. Amer. Chem. Soc. 1905*, **27**, *p. 935 à 946*), constatent que les graines d'arachide de lin, de coton, à l'état de vie ralentie possèdent un pouvoir lipolytique à peine perceptible et qui n'est pas activé par l'addition des acides minéraux.

Si au contraire on laisse germer pendant 2 jours les graines d'arachide ou de lin la diastase manifeste sa présence par une forte hydrolyse au contact d'une huile d'amandes douces.

Ces auteurs firent des extraits en triturant avec du sable

les graines d'arachides germées et en soumettant ce mélange à une pression de 250 atmosphères.

En jetant le liquide sortant après cette expression, dans de l'alcool on obtient un précipité volumineux, qui lavé, puis séché, a un grand pouvoir hydrolysant. Le précipité obtenu en traitant de la même façon les graines de lin germées est inactif.

En 1907, E. Hoyer indique dans le *Zentralblatt* (*p. 6465*), la préparation d'une émulsion lipolytique : des graines de ricin sont broyées avec de l'eau. On centrifuge le liquide laiteux. L'émulsion contient l'enzyme et la plus grande partie de l'huile émulsionnée avec les albumines insolubles du protoplasma — puis on laisse en repos à 24° C. Par suite de la fermentation qui se déclare, l'émulsion contenant le ferment se rassemble à la surface en une couche épaisse qui peut être recueillie facilement.

II. — *Préparations sèches.* — En 1912 (*8th Cong. of Intern^l Appl. Chemistry, J^l Amer. Chem. Soc. 1912, p. 884*) Y. Tanaka montra une poudre lipolytique ainsi obtenue : 100 gr. de graines de ricin pressées ou dégraissées par l'éther de pétrole ou l'éther, sont triturés avec 600 à 700 cc. d'acide acétique décinormal ou avec 500 cc. de $SO^4 H^2$ $\frac{1}{10}$ N pendant 30' à 30°-35 C, on filtre pour séparer du liquide laiteux. Le résidu est bien lavé à l'eau puis séché à une température ne dépassant pas 40° C. Cette poudre de lipase est blanche, inodore et reste très longtemps active.

En 1913, Armstrong et W. Gosney (*Proc. Roy. Soc.*) obtiennent des préparations de lipases très actives en traitant les graines de ricin décortiquées et broyées par de l'éther et de l'éther de pétrole ; ils font digérer le résidu pendant 5 minutes avec 80 cc. d'acide acétique décinormal pour chaque 10 gr. de

farine et après décantation du liquide le résidu est lavé, séché dans le vide, broyé et tamisé au travers d'une mousseline. Il reste 9 o/o du poids original des graines. Les expériences furent faites dans des fioles en verre dur, permettant l'agitation du mélange d'huile et de poudre. Cette préparation est gênée par les acides dilués et rendue inactive par un excès.

En 1914, N. Tanzew publie dans le Zentralblatt, une nouvelle préparation : les graines de ricin décortiquées sont broyées avec de l'huile de ricin. On centrifuge jusqu'à ce que le précipité soit composé de 2 parties ; au moyen d'éther pur on enlève la partie la plus friable. Après filtration de cette émulsion, il reste une poudre dont l'activité baisse déjà après quelques semaines.

En 1918, Willstätter à Munich, prit les 2 brevets suivants :

1° — *n° 316.505 Ger. Pat. du 5-9-1918* : on obtient une préparation stable en faisant absorber la lipase contenue dans une suspension ou une émulsion par du Kieselguhr, du Kaolin, du talc, du sulfate de baryum ou du charbon.

2° — *n° 317.503 Ger. Pat. du 25-9-1918* : on fait absorber la lipase contenue dans une émulsion ou une suspension par de petits morceaux (gros comme une petite graine) de pierre ponce, de bois ou de noir animal et par d'autres corps du même genre.

Enfin mentionnons encore, entre autres mémoires, les deux suivants :

En 1904, S. Fokin (*Chem. Rev. f. Fett und Harz Ind 1904* - II, *118-120, 139-141, 167-170, 193-195, 224-226, 244-247*) déclare :

1° qu'il n'y a pas de différence dans l'action hydrolysante de graines de ricin venues de la forme commune ou des diverses variétés cultivées dans les jardins ;

2° que le fait de conserver les graines longtemps n'influe pas sur l'activité diastasique des graines de ricin ;

3° qu'une température de 20° C a le même effet qu'une température de 35° C si la lipase agit sur une matière grasse liquide.

Pour les corps gras solides il faut amorcer la réaction par du CO^2 à une température de 35° C et en présence d'une certaine proportion d'eau.

A la 2e hypothèse de S. Fokin répondent deux articles de MM. A. Nemec et F. Duchon parus dans les *C. R. n° 20 p. 935 - 14 Nov. 1921* et dans les *Annales de la Science agronomique, 6, p. 323, de Novembre-Décembre 1921* :

En faisant agir des graines de moutarde blanche récoltées en 1900-1910-1920 sur de l'huile de ricin, les auteurs arrivent à cette conclusion : « On voit que l'action des diastases hydrolysantes peut survivre à la perte du pouvoir germinatif de la graine. La catalase se conduit différemment ». Par contre, avec des graines de navette et de tournesol, agissant aussi sur l'huile de ricin, les auteurs aboutissent à cette autre conclusion : « On voit que les vieilles graines d'une faible vitalité ne possèdent qu'une activité lipodiastasique fortement diminuée. Ce fait s'accorde avec l'altérabilité bien connue des graines oléagineuses qui sont rapidement modifiées chimiquement et perdent en même temps leur pouvoir germinatif ».

De l'exposé de la littérature publiée au sujet des lipases végétales il résulte donc que :

1° : Aucun auteur n'a mentionné à propos des graines de ricin la variété employée, ni l'âge de celles-ci, sauf la phrase plutôt vague de S. Fokin (1904)

2° : On ne sait pas comment les huiles hydrolysées ont été obtenues (par pression ou par extraction avec un dissolvant).

3° : Aucune indication précise ne permet d'appliquer à toutes les graines de ricin ou à toutes les huiles, pour n'importe quelle température le fait généralement admis jusqu'à présent : le SO^4Mn active l'action des lipases.

Il m'a semblé que ces lacunes devaient être comblées et qu'une étude méthodique était nécessaire pour montrer l'action de :

1° : Différentes variétés de graines de ricin ;

2° : Différentes sortes de graines oléagineuses (entre autres des graines de coton, où j'ai réussi, je crois le premier, à démontrer la présence d'une lipase dans les graines germées) sur différentes huiles siccatives, mi-siccatives et non siccatives.

Au cours de mes recherches j'ai remarqué que l'hydrolyse de telles huiles variait suivant :

I. *Le mode d'obtention de l'huile* (par pression ou par extraction au moyen de différents solvants).

II. *L'âge de la graine de ricin* agissant sur une même huile obtenue par tel ou tel procédé.

III. *Le sel minéral ajouté* :

J'ai donc adopté le plan de travail suivant :

Chapitre I. — Lipase de graines de ricin

Je me suis servi, pour les expériences décrites dans ce chapitre, de graines de ricin :

I. *Jeunes :* a) gros ricin sanguin du Brésil 1921 ;
b) gros ricin blanc moucheté du Brésil 1921 ;
c) gros ricin marbré du Brésil 1921.

II. *Agées :* a) ricin Minor 1904 ;
b) ricin Gibson 1904.

La description détaillée de toutes ces sortes se trouve dans la brochure de M. le Professeur H. Jumelle : *Sur la culture, à Marseille, des diverses variétés de ricin en 1918.*

J'ai fait agir ces graines oléagineuses broyées sur des huiles :

§ 1er. — *Non siccatives,* comme l'huile d'olive obtenue par pression (indice de saponification = 190,4).

§ 2. — *Siccatives,* comme l'huile de lin obtenue par pres-

sion et par extraction au moyen de CCl^4 (indice de saponification = 193,5).

§ 3. — *Mi-siccatives*, comme l'huile de soja obtenue par pression et par extraction au moyen du CCl^4 (indice de saponification = 192,4).

§ 4. — *Huiles de ricin* obtenues par pression (huile médicinale) et par extraction au moyen de CCl^4 (indice de saponification = 176,8).

Chapitre II. — Lipase de graines de coton

J'ai fait agir cette lipase sur les huiles siccatives, mi-siccatives et non siccatives déjà nommées ainsi que sur les huiles :

de coton obtenue par pression ;

de sinapis sinensis obtenue par pression ;

de sésame obtenue par CCl^4 ;

de tournesol obtenue par CCl^4 ;

de kapok obtenue par CCl^4 ;

de niger obtenue par CCl^4 ;

Toutes les expériences ont été faites à différentes températures avec ou sans addition de l'un ou de l'autre de ces deux sels minéraux, à la dose de 0 gr. 02 pour chaque expérience : 1° *le sulfate de manganèse*, déjà connu pour son action activante dans l'hydrolype des huiles par la lipase du ricin ; 2° *le phosphate bipotassique*, qu'aucun auteur n'a encore employé et qui m'a paru, dans certains cas, favoriser beaucoup plus que le sel précédent l'action de la lipase du coton sur différentes huiles.

MODE OPÉRATOIRE

Afin de pouvoir mieux juger des causes et des résultats des expériences j'ai toujours employé les graines de ricin et de coton décortiquées, puis broyées dans un mortier et non pas les extraits diastasiques liquides ou sous forme de préparations sèches plus ou moins stables.

On connait aujourd'hui encore très peu les facteurs influençant l'activité des lipases. Donc les manipulations et les traitements physiques ou chimiques que subit la graine lorsqu'on cherche à obtenir cette préparation lipodiastasique, peuvent soit activer soit affaiblir la lipase contenue dans la graine. J'ai voulu me mettre à l'abri de cette cause perturbatrice.

Dans l'étude comparative que j'ai voulu faire, il m'a paru plus rationnel de me servir de la diastase telle qu'elle existe dans la graine, où elle est accompagnée de matières minérales, grasses et albuminoïdes, etc. qui toutes ensembles donnent peut-être à la lipase ses propriétés.

Cette méthode est en somme celle suivie dans la préparation de la « glycérine de fermentation ». On fait agir sur l'huile une liqueur crémeuse obtenue par broyage de la graine de ricin dans l'eau et par abandon à lui-même, pendant quelques jours, de ce liquide laiteux. Cette émulsion comprend environ 38 °/o d'acides gras, 58 °/o d'eau et 3 °/o de substances albuminoïdes y compris l'enzyme (H. Jumelle : Les huiles végétales, 1921).

C'est aussi pour ces raisons que je n'ai fait durer la plupart de mes expériences que pendant 2 heures au plus. Cela me dispensait d'employer des antiseptiques comme le toluène préconisé par Buchner (*Die Zymasegärung, p. 176*) ou le chloral dont se servirent F. Dunlap et W. Seymour (*J^l Amer. Chem. Soc., 1915*).

De plus comme nos connaissances sur la lipase sont, à l'heure actuelle fort restreintes il me parait bien difficile de prédire l'effet de tel ou tel antiseptique quand l'enzyme actif se trouvera dans tel ou tel milieu.

Dans beaucoup de cas où j'ai fait durer mes expériences pendant 72, 96 ou 120 heures j'ai constaté une diminution d'acidité (et non une augmentation qui aurait dû apparaître par suite d'interventions microbiennes).

Dans les nombreuses expériences que j'ai faites je n'ai jamais pu constater la présence de moisissures, etc., ce qui pourrait s'expliquer par le caractère antiseptique propre aux huiles bien que l'humidité du milieu, la température, et la présence des autres composants de la graine eussent pu créer un bon milieu de culture pour une ou plusieurs sortes de bactéries ou de moisissures.

Pour extraire l'huile des graines oléagineuses au moyen de dissolvants on a recours le plus souvent, quand il s'agit d'opérations quantitatives au procédé à chaud au moyen de l'appareil de Soxhlet ou de celui de G. B. Stokes (*Analyst, 1914*, 39-295).

Les farines de graines restent pendant 6 heures au contact des vapeurs chaudes du dissolvant qu'on fait bouillir dans ce but et c'est sur ce tourteau, plus ou moins chaud, que tombera, venant du réfrigérant, le dissolvant liquéfié. J'ai préféré pratiquer l'extraction à froid, j'ai laissé la farine de graines en contact avec le dissolvant pendant quelques heures en agitant de temps en temps, puis j'ai ôté le dissolvant par filtration et le liquide clair et limpide contenant l'huile dissoute dans le dissolvant fut distillé.

J'ai employé ce procédé pour éviter une altération possible par la chaleur, de l'huile ou du dissolvant et une réaction possible du dissolvant décomposé sur l'huile. Par cette méthode le dissolvant ne subit la chaleur que pendant la courte durée de la distillation.

Pour faire l'hydrolyse le procédé suivi était le suivant : dans une petite fiole en verre épais, à col court et large j'introduisais pour chaque expérience 7 cc. d'huile, 4 cc. d'acide acétique à 2,5 % puis 5 gr. de graines (ricin ou coton) décortiquées, pelées et finement broyées. Au moyen d'un agitateur en verre j'ai trituré ensuite le mélange : « a short vigorous trituration » est recommandé par F. Dunlap et W. Seymour (*J^l Amer. Chem. Soc., 1915*). On obtient ainsi une bonne émulsion.

Cette fiole était mise ensuite dans une étuve bien réglée où la température restait constante.

Quand l'hydrolyse avait duré pendant le temps voulu j'ajoutais quelques gouttes de phtaléine, 25 cc. d'alcool à 95° et je titrais l'acidité par la soude normale.

Cette méthode, préconisée par MM. G. Bertrand et P. Thomas de l'Institut Pasteur de Paris (*Manipulations de chimie biologique*) avait été suivie par MM. Nemec et Duchon dans leurs travaux (*C. R.* 20, *p. 935, 14 nov. 1921*).

CHAPITRE PREMIER

Expériences avec la lipase du ricin

J'ai examiné l'action lipolytique de la lipase contenue dans des graines appartenant à 4 variétés différentes de ricin.

J'ai fait successivement agir cette lipase sur une huile non siccative, une huile siccative et une huile mi-siccative.

Huile non siccative. — L'huile employée a été de l'huile d'olive, dite surfine dans le commerce, et vendue comme ayant été obtenue par *pression*.

A) J'ai fait agir des *graines jeunes* :

a) Gros ricin sanguin du Brésil ;

b) Gros ricin marbré du Brésil ;

c) Gros ricin blanc moucheté du Brésil

récoltées toutes trois en 1921 à Marseille par M. le Professeur H. Jumelle, mais différant entre elles par leur couleur, leur taille et leur aspect physique.

Le tableau I montre qu'à 16° et 32° C., avec ou sans addition de sulfate de manganèse l'hydrolyse est à peu près aussi forte dans les 3 séries d'expériences.

Les petits écarts constatés sont dus probablement :

1° A la différence de l'acidité initiale ce qui a naturellement sa répercussion sur la marche de l'hydrolyse car suivant M. Nicloux les acides aminés favorisent l'hydrolyse ;

2° Au développement plus ou moins parfait de la graine car dans un lot de mêmes graines du gros ricin sanguin j'ai rencontré des graines petites et des graines normalement developpées dont l'acidité initiale variait. A 40° C, l'addition de

SO^4Mn excite la lipase du gros ricin marbré mais gêne l'action du gros ricin sanguin et celle du gros ricin blanc moucheté.

On pourrait peut-être expliquer la diminution de l'acidité avec cette dernière variété de graines par la difficulté qu'elles ont eu à mûrir sous le climat de Marseille.

A l'heure actuelle on ne peut trouver les raisons qui ont provoqué avec le gros ricin sanguin cette sorte de rétrogradation. Déjà en 1905 F. Dunlap et W. Seymour avaient remarqué ce phénomène sans pouvoir l'expliquer

Dans d'autres expériences d'hydrolyse, par exemple dans le cas de la lipase du coton agissant sur l'huile de coton, l'acidité baisse après une certaine durée d'hydrolyse pour remonter après, quand l'expérience durera plus longtemps.

B) En remplaçant les graines de ricin âgées d'un an par des *graines âgées* de 18 ans, on constate que l'hydrolyse est encore très forte, bien que l'acidité produite soit moindre que dans le cas précédent.

Sur la même huile d'olive j'ai fait agir le *Ricinus Minor* récolté en 1904 par M. le Professeur H. Jumelle à Marseille.

Le tableau IV montre que, dans ce cas, la température optima est 32° C, avec ou sans addition de SO^4Mn; l'acidité est alors la plus forte. A 40° C, après 2 heures de contact, en présence ou en l'absence de ce sel minéral, l'acidité est plus faible que celle obtenue à 16° C ou 32° C.

Le sulfate de manganèse paraît gêner à 40° C.

Donc en présence de graines de ricin jeunes ou âgées, cette huile non siccative subit une hydrolyse aussi intense.

La température de 40° C produit une rétrogradation quelle que soit l'âge de la graine de ricin employée.

On peut se demander si l'acidité trouvée dans les expériences précédentes ne pourrait pas avoir été provoquée soit

par une autodigestion protéolytique des graines soit par l'hydrolyse de la petite quantité d'huile contenue dans les 5 gr. de graines employées dans chaque expérience.

J'ai, par suite, fait les expériences suivantes pour voir :

1° Quelle serait l'acidité obtenue par une autolyse de 5 gr. de ricin sanguin ou de ricin marbré :

2° Quelle serait l'acidité maxima obtenue après un très long contact de la graine et de l'huile ;

3° Si l'hydrolyse était bien provoquée par la diastase.

Dans ce dernier cas une température élevée et prolongée devrait tuer cet enzyme (car seule la catalase résiste à une température de 100° C).

1° **Autolyse.** — Pour ces expériences je me suis naturellement mis dans les mêmes conditions expérimentales que précédemment mais en n'employant pas les 7 cc. d'huile que j'ai remplacés par 7 cc. de glycérine pure et neutre.

En agissant ainsi je mettais la lipase dans des conditions défavorables car la glycérine est un produit de l'hydrolyse. Or l'addition de 4 cc. d'acide acétique à 2,5 °/₀ à une graine broyée provoque la formation de petits grumeaux dus à la coagulation des matières albuminoïdes, ce qui rend le titrage de l'acidité, en présence d'alcool, fort difficile. La quantité d'huile contenue dans les graines seules était trop petite pour produire une émulsion : j'ai du trouver un liquide afin de diluer et de bien homogénéiser le mélange.

L'eau et l'alcool affaiblissent la diastase, il ne me restait donc qu'à suivre la méthode à la glycérine que MM. Nemec et Duchon ont aussi employée.

1° *Expérience.* — J'ai introduit dans chaque fiole en verre 5 gr. de ricin sanguin broyé, 7 cc. de glycérine et 4 cc. d'acide acétique à 2,5 °/₀. Une fiole identique, titrée de suite donna une acidité : 3 cc. NaOH N.

Quelques fioles furent laissées à 16° C, d'autres furent mises dans une étuve à 32° C. Les unes furent additionnées de SO^4Mn, d'autres ne reçurent aucun sel minéral.

Température	Durée	SO^4Mn	Acidité produite neutralisée par
16° C	2 heures	sans	5,85 cc NaOH N
		avec	6,20 cc »
32° C	2 heures	sans	5,90 cc »
		avec	7,20 cc »
32° C	18 heures	sans	6,90 cc »

En présence d'huile d'olive, nous avions obtenu :

témoin : 7,3 cc NaOH N

Température	Durée	SO^4Mn	Acidité produite neutralisée par
16° C	2 heures	sans	26,65 cc NaOH N
		avec	25,05 cc »
32° C	2 heures	sans	27,70 cc »
		avec	26,90 cc »
32° C	18 heures	sans	38 cc »

L'augmentation de l'acidité doit provenir de l'huile d'olive ajoutée.

Seconde expérience : Avec le gros ricin marbré 1921, en présence de glycérine l'acidité devient :

témoin titré de suite : 2,3 cc NaOH N

Température	Durée	SO^4Mn	Acidité produite neutralisée par
16° C	2 heures	sans	7,10 cc NaOH N
		avec	7,30 cc »
32° C	2 heures	sans	8,20 cc »
		avec	7,45 cc »
32° C	18 heures	sans	5,95 p. échantillon I
			5,60 » II

Si on remplace la glycérine par l'huile d'olive, nous obtenons les chiffres suivants :

Température	Durée	SO^4Mn	Acidité produite neutralisée par
16° C	2 heures	sans	28,60 cc NaOH N
32° C	2 heures	sans	27,70 cc »
		avec	27,65 cc »
32° C	18 heures	sans	35,45 cc »

Ce qui montre encore une fois qu'avec le ricin marbré, comme avec le ricin sanguin, l'autolyse en l'absence d'huile d'olive ne donne qu'une très légère acidité.

2° **Acidité maxima** : *Avec le gros ricin sanguin* 1921, et exactement dans les mêmes conditions expérimentales, l'acidité est devenue avec une huile d'olive, à 32° C — sans l'addition de SO^4Mn :

Au bout de 18 h. { échantillon I : 37,90 cc NaOH N
échantillon II : 38,70 »

Au bout de 24 h. { échantillon I : 38,65 cc NaOH N
échantillon II : 39,20 »

Au bout de 48 h. { échantillon I : 37,05 cc NaOH N
échantillon II : 37,30 »

Au bout de 72 h. { échantillon I : 33,70 cc NaOH N
échantillon II : 34,05 »

Avec le gros ricin marbré - à 32° C :

Au bout de 18 h. 35,45
» 24 h. 34,70
» 48 h. 34,45
» 72 h. 30,80

Nous remarquons donc qu'avec une même huile d'olive ces deux graines se conduisent d'une façon identique ; à 32° C la diminution de l'acidité se manifeste dans le cas du gros ricin

sanguin après 48 heures et chez le gros ricin marbré après la même durée d'expérience.

3° **Influence de la diastase.** — Les expériences suivantes ont pour but de montrer que l'hydrolyse est bien produite par une diastase. En mettant les graines de ricin dans de l'eau bouillante, il est évident que si celles-ci contiennent une diastase, celle-ci devra être tuée et il ne devra pas se produire d'hydrolyse si on met les graines ainsi traitées au contact d'une huile.

Donc j'ai introduit 5 gr. de *graines de ricin sanguin* du Brésil 1921 dans de l'eau bouillante. Les graines décortiquées et pelées étaient entières. Après une ébullition de durée variable, elles furent séchées sur du papier filtre à 16° C puis elles furent broyées et mises en contact avec 7 cc d'huile d'olive surfine et 4 cc d'acide acétique à 2,5 % à 32° C.

1re expérience : ébullition ayant durée 30 minutes : témoin titré de suite : 7,30 cc NaOH N.

Après 3 h. de contact à 32° C, l'acidité du mélange = 7,65 cc NaOH N
» 18 h. » » » = 7,40 »

2e expérience : si on prolonge l'ébullition pendant une heure :
Après 1 h. de contact à 32° C, l'acidité = 3,10 cc NaOH N
» 3 h. » » » = 2,95 » »

L'acidité est donc ici plus faible, ce qui peut être dû à deux causes :

1° La chaleur prolongée a pu provoquer des réactions chimiques à l'intérieur de la graine.

2° La chaleur prolongée provoqua de petites fentes dans les graines (que j'avais choisies exprès entières) par où des composants acides de la graine ont pu s'échapper puis se mêler ou se dissoudre dans le milieu aqueux environnant.

3e expérience : 2 lots de 5 graines de ricin furent mis à bouillir pendant 1 h. avec de l'eau.

Le lot n° 1 fut traité comme précédemment et s'il fut mis en contact avec 7 cc d'huile d'olive et 4 cc d'acide acétique à 2,5 °/₀ pendant 1 h. l'acidité était devenue = 3,10 NaOH N.

Le lot n° 2 fut, tout comme le précédent, broyé et mis dans une fiole contenant 7 cc d'huile d'olive et 4 cc CH^3 COOH à 2,5 °/₀. A ce mélange, j'ai ajouté 5 gr. de graines de ricin sanguin fraîches.

Le tout fut laissé 45^m à 32° C. L'acidité est alors = 30,60 NaOH N.

J'ai fait tout d'abord bouillir les graines du *gros ricin marbré 1921 pendant 30^m* ; puis ces graines ont été mises en présence de 7 cc d'huile d'olive et 4 cc CH^3 COOH à 2,5 %.

Témoin : 4" 95 NaOH N :

Après 3 h. à 32° C, l'acidité devient = 5,70 cc NaOH N.
» 18 h. » » = 4,80 »

Après *une ébullition préalable d'une heure* et au contact du même mélange d'huile et d'acide acétique, l'acidité n'est plus que de :

Après 3 h à 32° C = 2,95 cc NaOH N ;
» 18 h. » = 2,60 »

Les 3 séries d'expériences précédentes démontrent donc que :

1° La forte acidité constatée dans le contact des graines de ricin sanguin et de ricin marbré est provoquée par l'hydrolyse de l'huile d'olive ajoutée.

2° Cette hydrolyse atteint presque le chiffre d'hydrolyse maxima que peut subir l'huile d'olive dans ces conditions.

3° Ces hydrolyses sont provoquées par la diastase lipolytique.

Huile siccative. — Après avoir étudié l'action de la lipase de graines de ricin jeunes ou âgées sur une huile non siccative comme l'huile d'olive, il m'a paru intéressant de voir comment se conduit cette même lipase, vieille ou jeune, sur

une huile siccative comme l'huile de lin. J'ai employé une huile de lin obtenue par pression et une huile obtenue par les dissolvants.

1° *Huile de lin de pression.* — Sur une huile de lin obtenue par pression, j'ai fait agir le *ricin sanguin* 1921. L'hydrolyse est aussi intense qu'avec l'huile non siccative précédemment étudiée et, ainsi que le montre le tableau II, à 16° - 32° et 40° C, l'addition de Mn SO^4 favorise l'action de la lipase.

Si sur cette même huile de lin je fais agir maintenant une *graine de ricin âgée de 18 ans*, par exemple le *ricin Minor* de 1904, nous voyons d'après le tableau IV, qu'après un contact de 30^m, il y a moins d'acidité produite qu'avec une graine fraîche.

Après une durée d'expérience de deux heures à 16° C, les chiffres indiquant l'acidité sont un peu plus forts ; à 32° C, SO^4Mn gêne et à 40° C, l'acidité est beaucoup plus faible en présence ou en l'absence de SO^4Mn que celle provoquée par le ricin sanguin à cette même température.

2° *Huile de lin d'extraction.* — J'ai traité les graines de lin broyées par du tétrachlorure de carbone. La distillation de celui-ci laisse une huile fortement colorée et sur cette huile de lin ainsi obtenue j'ai fait agir une *graine de ricin âgée de 18 ans*, le ricin Gibson 1904.

Un témoin titré de suite indiquait une acidité = 3,2 cc NaOH N. L'acidité produite dans cette hydrolyse devenait :

Température	Durée	SO^4 Mn	Acidité produite neutralisée par
16° C	2 heures	sans	20,40 cc NaOH N
		avec	22,70 cc »
32° C	2 heures	sans	18,30 cc »
		avec	24,80 cc »

Nous voyons que SO^4Mn active la lipase.

Donc en faisant agir sur des huiles siccatives comme l'huile de lin, que cette huile soit obtenue par pression ou par extraction, des graines de ricin jeunes ou âgées, nous voyons qu'il y a de petites différences dans l'acidité produite, mais que, somme toute, les hydrolyses sont de la même intensité et peu différentes de celle produite avec ces deux variétés de graine sur une huile non siccative.

Huile mi-siccative. — Nous avons vu qu'avec des huiles non siccatives comme l'huile d'olive ou siccatives comme l'huile de lin l'âge de la graine de ricin ou le mode d'obtention de l'huile influent peu sur la marche générale de l'hydrolyse.

En mettant ces mêmes variétés de ricin en contact avec une huile mi-siccative comme l'huile de soja, des différences notables vont se manifester : l'acidité varie beaucoup suivant l'âge de la graine de ricin et suivant la méthode employée pour obtenir l'huile.

N'ayant pu me procurer qu'une très petite quantité d'huile de soja obtenue par pression je n'ai pas pu comparer l'hydrolyse de cette huile par une graine jeune et par une graine âgée de 18 ans.

1° *Huile de pression.* — J'ai fait agir le *Ricinus Minor 1904* sur une huile de soja dite brute, obtenue par pression, de couleur foncée et ayant un indice de saponification : 192,5.

Le tableau IV montre que l'hydrolyse est lente au début mais, après 2 h. de contact, produit à 16° et à 32° C une acidité à peu près égale à celle obtenue avec des huiles non siccatives et siccatives. A ces 2 températures SO^4Mn parait gêner. Mais à 40° C l'acidité produite est beaucoup plus faible tandis que SO^4Mn favorise l'hydrolyse.

2° *Huile d'extraction.* — J'ai traité des graines de soja d'Etampes par du tétrachlorure de carbone. Quand celui-ci avait été chassé par distillation il restait une huile d'une

belle couleur orange, parfaitement limpide ; à l'odeur on pouvait reconnaître facilement que tout dissolvant n'avait pas été enlevé.

a) *Graines jeunes.* — J'ai fait agir sur cette huile le gros ricin sanguin 1921 ; le tableau V montre qu'à 16° et 32° C l'acidité produite diffère peu en intensité de celle produite par les autres huiles de pression (huiles d'olive et de lin) déjà étudiés. A 40° C les différences deviennent notables et l'huile de soja est la moins hydrolysée.

b) *Graines âgées.* — Si maintenant je fais agir sur cette même huile de soja une graine âgée, le *Ricinus Minor* 1904, aucune hydrolyse pour ainsi dire ne se produit.

A 16°, 32° et 40° C l'addition de SO^4Mn provoque, il est vrai une augmentation d'acidité, mais celle-ci est insignifiante si on la compare avec celle obtenue précédemment avec l'huile de soja de pression, traitée par le même *Ricinus Minor*

Huile de soja par CCl^4 et *Ricinus Minor 1904.*

Témoin 2,75 cc NaOH N :

Température	SO^4 Mn	Durée	Acidité produite neutralisée par
16° C	sans	30 m	6,40 cc NaOH N
		2 heures	10,30 cc »
	avec	30 m	6,80 cc »
		2 heures	10,55 cc »
32° C	sans	30 m	6,50 cc »
		2 heures	8,00 cc »
	avec	30 m	7,60 cc »
		2 heures	8,25 cc »
40° C	sans	30 m	7,00 cc »
		2 heures	7,35 cc »
	avec	30 m	7,70 cc »
		2 heures	9,05 cc »

Ce résultat surprenant suggère plusieurs hypothèses.

En premier lieu, la cause peut être cherchée dans l'huile même. Celle-ci provenait en effet de graines de soja d'Etampe d'âge indéterminée. J'ai donc traité des graines de soja nouvellement récoltées à Marseille par M. le Professeur Jumelle, au moyen du même tétrachlorure de carbone et dans les mêmes conditions expérimentales que précédemment.

J'ai arrêté la distillation du dissolvant au moment où l'huile avait la même couleur (sous la même épaisseur) et la même odeur que l'huile de soja employée dans les expériences déjà citées plus haut.

Sur cette huile ainsi obtenue j'ai fait agir le ricin Gibson récolté en 1904.

Le tableau suivant indique la marche de l'hydrolyse à différentes températures, avec ou sans addition de sulfate de manganèse.

témoin 3,05 cc NaOH N

Température	Durée	SO^4 Mn	Acidité produite neutralisée par
16° C	2 heures	sans	9,05 cc NaOH N
		avec	9,25 cc »
32° C	2 heures	sans	8,40 cc »
		avec	9,10 cc »
40° C	30 m	sans	4,60 cc »
		avec	6,10 cc »
40° C	2 heures	sans	6,40 cc »
		avec	7,40 cc »

Nous voyons qu'ici, comme dans le cas du *Ricinus Minor* 1904 l'hydrolyse de l'huile de soja obtenue par extraction au moyen du CCl^4 est très faible et que le sulfate de manganèse a un léger pouvoir excitant.

Comme il résulte du tableau V que cette même huile de soja est facilement hydrolysée par le *gros ricin sanguin* 1921 nous pouvons donc admettre que la très faible hydrolyse de

cette même huile par les graines *Ricinus Minor* 1904 et *Ricin Gibson* 1904 n'est pas due à la qualité de cette huile.

Nous sommes donc conduits à envisager une *seconde hypothèse* suivant laquelle la diastase serait peut-être partiellement paralysée dans ces 2 variétés de graines de ricin âgées de 18 ans. Or cette hypothèse se trouve déjà réfutée par les faits suivants :

1° Avec le *Ricinus Minor* l'huile de soja brute (tableau IV) est facilement hydrolysée et produit une acidité presque égale à celle donnée par les autres huiles de pression employées : huile d'olive et huile de lin.

2° La graine Gibson 1904 hydrolyse d'une façon active une huile de lin extraite de graines de lin au moyen du tétrachlorure de carbone, ainsi que le montre le tableau suivant :

témoin 3,20 cc NaOH N :

Température	Durée	SO^4Mn	Acidité produite neutralisée par
16° C	2 heures	sans	20,40 cc NaOH N
		avec	22,70 cc »
32° C	2 heures	sans	18,30 cc »
		avec	24,80 cc »

Cette huile de lin avait une couleur orange foncée, était limpide et claire et contenait une forte proportion de CCl^4. J'ai chassé par un courant de CO^2 à peu près tout le dissolvant, la couleur de l'huile devient brun noire, l'huile est plus épaisse et une odeur caractéristique remplace celle du CCl^4.

Les explications précédentes démontrent donc que des graines de ricin âgées de 18 ans produisent une forte hydrolyse quand elles sont mises en contact avec, soit des huiles obtenues par pression (huiles d'olive, de lin et de soja brute), soit une huile d'extraction comme l'huile de lin obtenue au moyen du CCl^4.

Donc ce n'est pas à un affaiblissement de la diastase lipolytique de ces vieilles graines de ricin qu'il faut attribuer la faible hydrolyse de l'huile de soja, obtenue au moyen du tétrachlorure de carbone.

Et on est ainsi conduit à envisager une *troisième hypothèse :* Le tétrachlorure de carbone est le facteur gênant.

Or nous venons de voir qu'une huile de lin, extraite par CCl^4 et non entièrement débarrassée de ce dissolvant est encore facilement hydrolysée par le ricin Gibson 1904.

Alors on peut supposer que c'est le mélange huile de soja + CCl^4 qui a fortement gêné l'hydrolyse.

Mais, en ce cas, si, à une huile de soja obtenue par pression et qui est hydrolysée par une vieille graine de ricin comme nous l'avons vu, nous ajoutons du CCl^4 nous devrons avoir reproduit le mélange gênant et la lipase âgée ne devra plus avoir beaucoup d'action.

Donc à 7 cc d'huile de soja brune, dite brute, obtenue par pression, j'ai ajouté 4 cc d'acide acétique à 2,5 0/0 et :

a) un demi-centimètre cube de CCl^4 pur. J'ai fait agir sur ce mélange 5 gr. de graines Gibson 1904.

témoin 4,25.

Après 2 h. à 16° C, sans SO^4 Mn l'acidité produite était neutralisée par 21,80 cc NaOH N.

b) J'ai ajouté, dans une expérience, 16 gouttes de CCl^4 pur au même mélange d'huile, d'acide et de graines Gibson.

Après 2 h. de contact à 16° C, l'acidité correspondait à 22,0 cc NaOH N.

En comparant ces 2 chiffres d'acidité avec celui obtenu dans l'action de l'huile de soja brute (donc la même huile) en présence du Gibson 1904, après 2 h. à 16° C : 21,55 nous devons conclure que ce n'est pas le CCl^4 qui peut être incriminé.

Pour démontrer d'ailleurs encore mieux que le tétrachlorure de carbone ne gêne pas l'action d'une vieille graine de ricin sur une huile de soja obtenue par ce dissolvant, j'ai enlevé à celle-ci tout le CCl^4 par une distillation, puis dans l'huile bouillant légèrement j'ai fait passer un courant de CO^2.

Aucune oxydation ne s'est produite, car avant comme après ces manipulations l'acidité était toujours neutralisée par 3 cc NaOH N.

Le tableau suivant montre que l'hydrolyse est faible :

Température	SO^4 Mn	Durée	Acidité produite neutralisée par
16° C	sans	30 m	10,20 cc NaOH N
		2 heures	16,15 cc »
	avec	30 m	4,50 cc »
		2 heures	8,30 cc »
32° C	sans	30 m	11,55 cc »
		2 heures	17,60 cc »
	avec	30 m	8,00 cc »
		2 heures	10,90 cc »
40° C	sans	30 m	9,90 cc »
		2 heures	11,30 cc »
	avec	30 m	5,80 cc »
		1 heure	6,40 cc »
		2 heures	8,60 cc »

d'où il résulte que SO^4 Mn gène à 16°, 32°, 40° C.

De ces expériences nous concluons que la faible activité de la lipase de vieilles graines de ricin, agissant sur une huile de soja extraite par CCl^4, n'est pas causée par la présence de ce dissolvant.

L'affaiblissement de la lipase âgée ne vient donc :

1° Ni de l'huile employée ;

2° Ni de l'âge des graines :

3° Ni de la présence du CCl^4.

Il ne resterait, dès lors, pour l'expliquer que cette *quatrième hypothèse* : Le dissolvant enlève à la graine en plus de l'huile, des corps qui gêneront ultérieurement l'hydrolyse.

Or quand le dissolvant avait été en contact avec la farine de graines, j'ai toujours filtré, ce qui me donnait un liquide parfaitement clair et légèrement coloré en jaune, contenant l'huile et le dissolvant.

C'est toujours d'un liquide sans aucun trouble, que j'ai enlevé le dissolvant par distillation.

On admet que la *benzine* C^6H^6 est un dissolvant général pour l'iode, le soufre, le phosphore, les graines, les résines, etc.

J'ai voulu voir si à des graines de soja ce dissolvant enlève également un corps qui pourrait paralyser l'hydrolyse d'une huile extraite par C^6H^6 .

La 2e partie du lot de graines de soja d'Etampes, extrait précédemment par CCl^4, a été alors traitée par C^6H^6 pur, cristallisable et vendue comme étant exempte de thiophène. Après filtration, le mélange d'huile et de benzine était limpide et parfaitement clair. Après distillation du dissolvant j'ai enlevé les dernières traces de ce dernier en étalant l'huile en couches minces que j'ai abandonnées pendant 2 jours et 2 nuits dans une étuve réglée à 45° C.

L'huile ne s'était pas oxydée pendant ce traitement car l'acidité était restée = 5,05 cc NaOH N.

J'ai traité ensuite cette huile par le ricin Gibson 1904 et l'hydrolyse se produit facilement.

Température	Durée	SO^4Mn	Acidité produite neutralisée par
16° C	2 heures	sans	21,90 cc NaOH N
		avec	23,20 cc »
32° C	2 heures	sans	20,10 cc »
		avec	20,15 cc »

Ainsi la benzine pure n'extrait pas des graines de soja un produit pouvant gêner l'hydrolyse.

Il ne reste, en définitive, qu'à supposer que le corps gênant a été extrait par le tétrachlorure de carbone, ou encore qu'il existe dans ce dissolvant.

Mais, en évaporant le CCl^4, qui m'a servi dans toutes mes expériences, il ne reste aucun résidu.

Par contre, si on extrait l'huile de soja par du CCl^4 et si on chasse ce dernier complètement par une distillation suivie d'une ébullition et passage à travers l'huile bouillante d'un courant de CO^2, on obtient une huile de soja brune et épaisse.

Mon attention s'est donc plus spécialement portée sur cette huile.

Je l'ai agitée avec un peu de benzine pure et j'ai obtenu une dissolution jaune clair parfaitement limpide, sans aucun louche ou trouble.

Un traitement identique par l'éther ou l'éther de pétrole donne exactement le même résultat.

J'ai aussi agité à froid l'huile avec de l'alcool à 95° après décantation de l'huile, la solution alcoolique ne laisse aucun résidu.

Quand on ajoute à l'huile de l'alcool chaud et quand on sépare puis évapore le liquide alcoolique, il reste un peu de matière grasse. Celle-ci est enlevée par la benzine pure et sur le verre de montre il ne reste aucun résidu.

Donc l'alcool n'a ôté à l'huile que quelques acides gras.

Lorsque toutefois on traite l'huile par de l'eau distillée, les résultats deviennent tout différents.

Après avoir redistillé de l'eau distillée, j'ai évaporé quelques gouttes de celle-ci. Il reste un résidu à peine visible à l'œil nu.

Si, au contraire, on fait bouillir l'huile avec cette eau redistillée et si on verse ce mélange dans une boule à décanter, on obtient une couche huileuse brune surnageant un liquide

incolore. L'évaporation de ce liquide aqueux laisse un résidu jaunâtre visible à l'œil nu mais en quantité très petite.

Pour en enlever des traces possibles d'huile, j'ai lavé ce résidu, à deux reprises, avec de la benzine. Celle-ci, après évaporation, ne laisse aucun résidu ; donc elle n'avait rien dissous du résidu jaunâtre.

Celui-ci avait les propriétés suivantes :

C'est une poudre jaune, adhérant au verre de montre malgré une dessication de 12 h. dans une étuve réglée à 37° C.

Si on la chauffe elle dégage une odeur spéciale ne rappelant en rien celle de la benzine ou celle du CCl^4 et différente de l'odeur âcre et désagréable que possède l'huile brune d'où elle provient.

Au microscope on voit qu'il s'agit ici d'un mélange, car au milieu d'une masse amorphe légèrement jaune se trouvent des cristaux cubiques rappelant par leur aspect ceux du chlorure de potassium.

Une parcelle de ce mélange fut délayée dans un peu d'eau. Des particules restent non dissoutes.

Si, à ce liquide on ajoute une goutte de nitrate d'argent, on a de suite un trouble qui persiste quand on ajoute deux gouttes d'acide nitrique concentré mais qui disparaît par addition de quelques gouttes d'ammoniaque.

Ce trouble provoqué par l'addition de NO^3Ag était donc bien du chlorure d'argent.

Le produit jaune contenait donc des chlorures.

J'en arrivais ainsi cette fois, à me demander si ce produit jaune était bien le corps gênant l'hydrolyse par une vieille graine de ricin d'une huile de soja extraite à l'aide de CCl^4.

En enlevant par une ébullition avec H^2O ce produit supposé gênant à une huile difficilement hydrolysable par une lipase âgée, la cause de la non hydrolyse aura disparu et l'hydrolyse d'une telle huile devra se faire normalement.

Donc je fais bouillir l'huile peu hydrolysable avec de l'eau. L'eau est enlevée, l'huile est séchée et je fais agir sur elle le Gibson 1904.

Témoin : 2,55

Après 2 h. à 32° C, sans SO^4Mn, l'acidité correspondait à 9,45 cc NaOH N.
— — avec SO^4Mn, — 9,95 cc —

L'hydrolyse reste faible. L'ébullition par l'eau n'a pas enlevé le corps gênant.

J'ajoute alors maintenant à une huile de Soja facilement hydrolysée par le Gibson 1904 et extraite par la benzine, un peu de ce corps supposé gênant. S'il l'est réellement, cette addition devra gêner l'hydrolyse.

Donc à une huile de Soja extraite par la benzine, j'ajoute le corps jaune et le Gibson 1904. Après un contact de 2 h. à 32° C, l'acidité est devenue = 24" 35 NaOH N, tandis que si si on n'ajoute pas ce corps gênant l'acidité devient = 22" 50. d'où il résulterait que dans ce cas, le corps jaune aurait favorisé l'hydrolyse au lieu de l'avoir gêné.

Après avoir décrit toutes ces expériences, je suis forcé d'admettre que je n'ai pas isolé le corps gênant et qu'il me paraît impossible d'expliquer pourquoi l'hydrolyse d'une huile de Soja extraite par CCl^4, par une vieille graine de ricin est si faible.

Huiles de Ricin. — Dans les expériences suivantes, j'ai étudié l'action lipolytique des graines de ricin datant de 1904 et de 1921 sur des huiles de ricin, l'une médicinale, c'est-à-dire obtenue par pression et épurée, l'autre que j'ai extraite de graines de ricin cochinchinoises au moyen de CCl^4.

Huile de ricin par extraction. — Sur cette huile j'ai fait agir 1° *des graines jeunes* du gros ricin marbré 1921. L'acidité obtenue :

Témoin : 6,90 cc NaOH N

Température	Durée	SO^4 Mn	Acidité produite neutralisée par
16° C	2 heures	sans	25,70 cc NaOH N
		avec	26,10 cc »
32° C	2 heures	sans	27,35 cc »
		avec	28,90 cc »

2° *Des graines âgées : ricin Gibson* 1904.

Témoin 5,60 cc NaOH N ; l'acidité devient :

Température	Durée	SO^4 Mn	Acidité produite neutralisée par
16° C	2 heures	sans	17,10 cc NaOH N
		avec	18,20 cc »
32° C	2 heures	sans	22,35 cc »
		avec	18,30 cc »

Donc sur cette huile de ricin d'extraction, une vieille graine a beaucoup moins de pouvoir lipolytique qu'une graine récente.

Huile de ricin médicinale. — Sur cette huile obtenue par *pression* et épurée, je fais agir :

1° *Des graines jeunes* comme le gros ricin marbré 1921.

Témoin 4 cc NaOH N ; l'acidité devient :

Température	Durée	SO^4 Mn	Acidité produite neutralisée par
16° C	2 heures	sans	26,50 cc NaOH N
		avec	26,45 cc »
32° C	2 heures	sans	32,30 cc »
		avec	30,40 cc »

Sur cette même huile j'ai fait agir aussi :

2° *Des graines âgées*, Gibson 1904.

Témoin 3,30 cc NaOH N.

Température	Durée	SO^4 Mn	Acidité produite neutralisée par
16° C	2 heures	sans	19,90 cc NaOH N
		avec	20,15 cc »
32° C	2 heures	sans	26,50 cc »
		avec	26,90 cc »

Sur cette huile de ricin médicinale, la vieille graine a moins d'action qu'une graine âgée d'environ un an, mais elle a beaucoup plus d'action que sur une huile de ricin extraite par CCl^4.

CONCLUSIONS

Les nombreuses expériences précédentes ont eu pour but de démontrer que dans l'étude de l'hydrolyse de différentes sortes d'huiles par des graines de ricin, les facteurs suivants jouent un rôle essentiel :

1° l'âge de la graine employée ;

2° la variété des huiles (non siccatives, mi-siccatives et siccatives) ;

3° le mode d'obtention de ces huiles ;

4° l'influence du sel minéral SO^4 Mn ;

5° la température où se fait l'hydrolyse.

Tout au moins pour les huiles que nous avons employées — car, dans ces premières recherches sur un sujet presque neuf, on ne peut que poser le problème et on doit éviter de trop vite généraliser — nous avons constaté les faits suivants :

§ 1er. — En faisant agir sur une *huile non siccative* comme l'huile d'olive obtenue par pression, des graines de ricin agées d'un an, l'hydrolyse est aussi active à 16° qu'à 32° C, en présence ou en l'absence de SO^4 Mn. A 40°, l'addition de SO^4 Mn

favorise l'action du ricin marbré 1921, mais gêne fortement le gros ricin sanguin 1921 et le gros ricin blanc moucheté 1921. Pour cette dernière variété de graines, la rétrogradation de l'acidité peut être attribuée à la maturation difficile de ces graines. Pour le gros ricin sanguin, ce phénomène ne peut, à l'heure actuelle, s'expliquer.

Si on fait agir sur cette même huile une graine de ricin *âgée de 18 ans*, par exemple *le Ricin Minor 1904*, la température d'hydrolyse optima est à 32° C.

A 16° et 32° C, SO^4Mn favorise l'hydrolyse tandis qu'il la gêne à 40° C.

Le paragraphe II consacré aux *huiles siccatives* montre que sur une huile de lin obtenue *par pression*, une hydrolyse aussi forte que celle obtenue avec une huile non siccative est produite par une *graine jeune* : le ricin sanguin 1921. Aux températures étudiées, 16°, 32° et 40°, le sulfate de manganèse a une action excitante.

Avec une graine âgée, l'hydrolyse est lente à se mettre en train.

Au bout de 2 h. de contact il y a plus d'acidité produite qu'avec une graine jeune — sauf à 40° avec ou sans sel de manganèse. A 32° C, So^4 Mn gêne un peu l'hydrolyse.

Avec une huile de lin *obtenue par extraction*, une vieille graine de ricin donne une hydrolyse à peu près normale au point de vue de l'acidité produite. Le SO^4Mn favorise l'hydrolyse dans ce cas.

§ III. — Tandis que les huiles non siccatives et siccatives subissent par l'action de graines de ricin jeunes ou âgées des hydrolyses à peu près aussi fortes, si on fait abstraction des petits écarts d'acidité finale obtenue, nous verrons à propos des huiles mi-siccatives, l'influence prépondérante de l'âge de la graine et du mode d'obtention de l'huile.

Sur une huile de Soja obtenue *par pression*, les graines de ricin âgées d'un an ou de 18 ans ont uue action lipolytique

aussi intense et l'acidité constatée est égale à celle produite par ces 2 variétés de graines sur des huiles non siccatives et siccatives.

Avec, au contraire, une huile de Soja extraite de graines de Soja d'Etampes au moyen de CCl^4, l'action de graines de ricin d'âge différent provoque une hydrolyse différente.

Tandis que l'acidité, provoquée par l'action de *graines jeunes*, montre des chiffres égaux à ceux constatés dans d'autres hydrolyses normales, quelles que furent les graines de ricin employées, l'hydrolyse produite par des *graines âgées de 18 ans* est beaucoup plus faible. J'ai tâché d'expliquer ce fait surprenant en émettant plusieurs hypothèses que des expériences annulent. L'affaiblissement de la lipase âgée constatée par l'hydrolyse plus faible de l'huile de Soja obtenue par extraction ne semble provenir :

1° ni de l'huile employée ;

2° ni de l'âge des graines ;

3° ni de la présence du CCl^4 ;

4° ni d'un corps gênant que le dissolvant aurait extrait des graines de Soja et qui se serait dissout dans l'huile.

Je n'ai pas pu isoler le corps gênant bien que j'aie traité l'huile de Soja par différents liquides. Je ne peux pas, non plus, appliquer à ces vieilles graines la conclusion de MM. A. Nemec et F. Duchon : « la diastase lipolytique s'affaiblit dans une graine incapable de germer ». Mes graines *Ricinus Minor* et Ricin Gibson 1904 étaient incapables de germer (des graines de ricin jeunes placées exactement dans les mêmes conditions d'aération et de température germaient facilement). Avec l'huile de Soja extraite des mêmes graines de Soja d'Etampes (qui avaient servi à l'extraction par CCl^4) au moyen de la benzine pure, ainsi qu'avec les autres huiles de pression ou d'extraction, ces vieilles graines donnaient des hydrolyses actives.

Il est curieux de remarquer que cette faiblesse de l'activité lipolytique dans de vieilles graines de ricin vis-à-vis de l'huile de Soja d'extraction se montre aussi dans l'hydrolyse des *huiles de ricin*.

§ IV. — Sur une huile de ricin médicinale, donc obtenue *par pression*, les graines de ricin vieilles ou jeunes, provoquent une hydrolyse de même intensité.

Si, au contraire, on les fait agir sur une *huile de ricin extraite de graines de ricin* cochinchinoises au moyen de CCl^4, l'hydrolyse produite par la graine âgée de 18 ans est beaucoup plus faible que celle produite sur la même huile par une graine jeune (bien que l'aciditée constatée soit plus élevée que dans l'hydrolyse de l'huile de Soja d'extraction par la même vieille graine).

Influence du SO^4Mn. — Sur la foi de quelques auteurs, on a admis jusqu'à présent que dans une hydrolyse au moyen de graines de ricin, le sulfate de manganèse a un pouvoir excitant. Cette idée très générale a même été appliquée dans les exploitations industrielles où on hydrolyse les huiles au moyen de solutions contenant la lipase.

Or, il résulte de mes nombreuses expériences, que le sulfate de manganèse, ajouté toujours à la même dose, toutes les conditions expérimentales étant restées identiques, avait une influence tantôt excitante, tantôt paralysante suivant :

1° l'huile sur laquelle agissait la lipase ;

2° la variété des graines de ricin ;

3° la température à laquelle se faisait l'hydrolyse ;

4° le mode d'obtention de l'huile.

Le tableau comparatif suivant montre les différentes influences du SO^4Mn :

I. — *Avec des graines de ricin jeunes.* — Dans l'hydrolyse d'une

Huile d'olive	par ricin sanguin 1921 . .	$MnSO^4$	gêne à 16° et 32° C. gêne à 40°
	par gros ricin marbré 1921	»	favorise à 16° C. influe peu à 32° C. gêne à 40°
Huile de lin (pression)	par ricin sanguin 1921	»	favor. à 16°, 32°, 40° C.
Huile de ricin (CCl^4)	par ricin marbré . .	»	favorise à 16° et 32° C.
Huile de ricin (pression)	par ricin marbré 1921	»	gêne à 16 et 32° C.
Huile de Soja (CCl^4)	par ricin sanguin 1921	»	favorise à 40° C. influe peu à 16 et 32° C.
Huile de Soja débarassée du CCl^4,	par ricin sanguin 1921	»	gêne à 16°, 32° et 40° C.

II. — *Graines de ricin âgées de 18 ans.* — Dans l'hydrolyse d'une

Huile d'olive,	par ricin Minor 1904. .	So^4Mn	favorise à 16°, 32° C gêne à 40° C
Huile de lin (pression)	par ricin Minor 1904	»	favorise à 16° et 40° C gêne à 32° C
Huile de lin (CCl^4)	par ricin Gibson 1904	»	favorise à 16° et 32° C
Huile de Soja (pression)	par ricin Minor 1904	»	gêne à 16° et 32° C favorise à 40° C
Huile de Soja (CCl^4),	par ricin Minor 1904	»	favorise à 16, 32, 40° C
»	» par Gibson 1904	»	favorise à 16, 32, 40° C
»	(benzine) par Gibson 1904	»	favorise à 16° et 32° C
Huile de ricin (CCl^4)	par Gibson 1904. .	»	favorise à 16° C gêne à 32° C
Huile de ricin (pression)	par Gibson 1904	»	favorise à 16° et 32° C

Il résulte donc de ce tableau que le sulfate de manganèse a une influence différente :

1° Suivant que la même lipase agit sur telle ou telle huile, par exemple le ricin sanguin 1921 agissant sur une huile d'olive et une huile de lin ;

2° Suivant la lipase employée mais agissant sur la même

huile, par exemplele gros ricin marbré ou le gros ricin sanguin agissant sur la même huile d'olive ;

3° Quel que soit l'âge des graines de ricin si celles-ci agissant sur la même huile par exemple SO^4Mn excite la lipase du Gibson 1904 et du ricin sanguin 1921 si on les fait agir sur la même huile de lin ;

4° Suivant la température à laquelle se fait l'hydrolyse.

Ces faits nous permettent donc de déclarer qu'un même sel minéral (dans ce cas SO^4Mn) a sur l'hydrolyse une action variable, favorisante ou entravente, suivant l'huile et suivant la lipase.

Les expériences décrites dans le chapitre suivant à propos de la lipase des graines de coton vont confirmer cette assertion.

CHAPITRE II

La lipase des graines du coton

Toute graine oléagineuse doit contenir, soit déjà lorsqu'elle est encore à l'état de vie ralentie, soit, en tout cas, pendant la germination, une lipase capable d'hydrolyser l'huile qu'elle contient ; et cette lipase peut évidemment agir aussi sur d'autres huiles, de provenances diverses.

Chez certaines Euphorbiacées les graines encore à l'état de vie ralentie peuvent déjà contenir une diastase lipolytique. Ce fait est bien établi pour les graines de ricin, il est connu aussi pour le *Croton Tiglium*. Par contre, nous n'avons pu personnellement constater cette présence dans des graines d'*Hevea brasiliensis*, récemment récoltées en Indochine et qui nous avaient été expédiées aussitôt après la récolte. Ces graines, il est vrai, n'ont pas germé.

En tout cas, la littérature publiée jusqu'à l'heure actuelle montre que de nombreux auteurs se sont efforcés de découvrir des lipases dans d'autres graines germées et non germées et en règle générale, sauf les deux exceptions que nous venons de rappeler, ne les ont constatés qu'après les débuts de germination.

Parmi les graines citées ne se trouvent pas les graines de coton ; il m'a paru donc intéressant de les étudier afin de voir à quel moment y apparait la lipase.

La présence de cette lipase une fois constatée il y aura lieu de voir son activité lipolytique sur des huiles non siccatives, mi-siccatives et siccatives.

Mes premières recherches ont donc porté sur des *graines de coton égyptien non germées*, âgées d'un an, portant à la partie supérieure quelques poils de coton.

Dans l'étude de leur action lipolytique, je me suis placé dans les mêmes conditions expérimentales que pour mes recherches sur les graines de ricin.

Germées ou non, les graines ont toujours été, au préalable, décortiquées. Pour les graines germées, j'ai employé le procédé suivant qui convient très bien vu la petitesse des graines et la dureté de la coque : en faisant tourner les graines entre le pouce et l'index et en pressant légèrement à l'extrémité de la graine opposée à celle où se trouve la radicelle, l'amande est projetée au dehors, la coque reste entre les doigts.

Avec les graines non germées et qui sont très dures ce moyen ne réussit pas et la séparation de la coque et de l'amande est très longue.

Il ne m'a pas été possible de constater dans des graines de coton non germées la présence d'une lipase active quelles que furent :

1° Les huiles employées (lin, coton, olive, obtenues par pression ou par extraction) ;

2° La durée des expériences.

1° Ainsi avec une *huile de lin* obtenue par pression :

5 gr. de graines pelées et délintées + 7 cc. d'huile de lin + 4 cc. d'acide acétique à 2,5 % donnent :

Après 1 h. 1/2, à 32° C ;

sans $MnSO^4$ une augmentation d'acidité de 0,10 cc NaOH N
avec $MnSO^4$ » » de 0,25 cc »

comparée avec l'acidité d'un témoin identique mais titré de suite.

2° Avec une *huile d'olive* :

Après 2 heures, à 32 C ;

sans Mn SO^4 une augmentation d'acidité de 0,40 cc NaOH N
avec Mn SO^4 » » de 0,45 cc »

comparée avec un témoin titré de suite.

3° Avec une *huile de ricin* (CCl^4) :

Après 2 heures à 16° C ;

sans Mn SO^4 une augmentation d'acidité de 0,22 cc NaOH N
avec Mn SO^4 » » de 0,65 cc »

Donc j'ai admis que dans la graine de coton non germée n'existait pas de lipase active.

J'ai poursuivi mes recherches sur le coton par l'étude de *graines germées*.

Pour faire germer les graines de coton aussi bien débarrassées que possible des poils de coton, je les ai mise :

1° Dans de la bonne terre de jardin humide contenue dans des pots en terre placés dans une serre chaude ;

2° Entre des doubles de papier filtre maintenus humides et placés dans une étuve réglée à 38° C.

Au bout de 3 jours 30 % de graines avaient germé. A ce moment la radicelle avait une longueur de 1/2 cm.

Après une germination totale de 6 jours la longueur de la radicelle était devenue : 2 1/2 cm.

Il m'a paru donc intéressant de comparer l'activité lipolytique de ces graines après différentes durées de germination.

I. Mes 1res expériences furent faites avec les graines dont la radicelle avait 1/2 cm. de longueur sur une huile non siccative : l'huile d'olive dite surfine.

témoin titré de suite 3,50 cc NaOH N.

L'acidité devient :

à 32° C, après 4 heures sans Mn SO^4 5,70 cc NaOH N
à 32° C, après 42 heures sans Mn SO^4 7,90 cc »
à 32° C, après 42 heures avec Mn SO^4 6,00 cc »

où nous voyons que SO^4 Mn gêne l'hydrolyse.

II. Quand la radicelle avait une longueur de 2 1 2 cm, la même huile d'olive donnait une acidité,

témoin 4,55 cc NaOH N :

à 32° C, après 4 h. sans Mn SO^4 : 5,10 cc NaOH N

à 32° C, après 42 h. sans Mn SO^4 ; 7,10 cc NaOH N

c'est-à-dire : plus la germination dure plus la lipase s'affaiblit.

III. En laissant la germination se poursuivre jusqu'à l'apparition des deux premières feuilles, j'ai obtenu avec la même huile d'olive une acidité,

témoin 3,90 :

Après 4 h. à 32° C, sans Mn SO^4 : 4,10 cc NaOH N.

Donc la lipase disparait à mesure que la plante grandit.

Donc toutes les expériences suivantes ont été faites avec des graines de coton dont la radicelle avait une longueur de 1/2 cm.

§ I. J'ai fait d'abord agir cette lipase du coton égyptien sur une huile *non siccative* comme l'huile d'olive, témoin : 3,10 cc NaOH N, avec ou sans addition de Mn SO^4 ce qui me permettrait de voir en même temps l'acidité maxima qu'on pouvait atteindre dans ces conditions :

Huile d'olive et lipase du coton à 32° C :

Durée	Sans Mn SO^4	Avec Mn SO^4	Avec phosph. bipot.
3 heures	5,60 cc NaOH N	5,00 cc NaOH N	6,10 cc NaOH N
18 »	6,10 cc »	5,25 cc »	6,75 cc »
24 »	6,65 cc »	5,85 cc »	6,80 cc »
48 »	6,90 cc »	7,95 cc »	6,95 cc »
72 »	8,45 cc »	8,60 cc »	7,35 cc »
96 »	5,70 cc »	5,45 cc »	6,80 cc »
120 »	5,35 cc »	5,45 cc »	6,05 cc »

d'où il résulte que sans Mn SO^4 l'hydrolyse maxima est obtenue après 72 h. de contact et qu'une rétrogradation de l'acidité se manifeste ensuite.

En présence de SO^4 Mn qui a fort peu d'influence et n'active pas la lipase, les mêmes phénomènes se produisent.

Voulant étudier l'action de l'acide phosphorique sur cette même lipase j'ai refait les mêmes expériences en remplaçant le SO^4 Mn par du phosphate bipotassique ajouté à la même dose.

D'après le tableau précédent nous voyons que la lipase est plus activée que par SO^4 Mn et que de nouveau ici après 72 h. de contact une rétrogradation d'acidité se manifeste.

Donc en présence d'une huile non siccative comme l'huile d'olive le SO^4 Mn paraît gêner, jusqu'à 72 h. de contact. Il excite un peu la lipase à ce moment et paraît hâter ensuite la rétrogradation.

Le phosphate bipotassique active bien la lipase pendant les 48 premières heures. L'acidité est moindre après 72 h. de contact mais la rétrogradation se fait en proportions moindres.

§ II. J'ai fait agir cette lipase de graines de coton sur des huiles *mi-siccatives obtenues aussi par pression.*

L'huile de coton était une huile parfaitement claire, de couleur jaune clair.

L'huile de sinapis sinensis c'est-à-dire une huile de Crucifères avait une couleur orange brune et était très claire aussi.

Sur la première de ces deux huiles j'ai refait les expériences me donnant l'acidité maxima obtenue après un long contact avec la lipase du coton, en présence et en l'absence de SO^4 Mn et en présence du phosphate bipotassique de potassium.

Huile de coton et lipase du coton à 32° C.

Témoin : 2,10 cc NaOH N, l'acidité devient :

Durée	Sans sel minéral	Avec Mn SO^4	Avec phosph. bipot.
3 heures	2,70 cc NaOH N	2,80 cc NaOH N	3,20 cc NaOH N
18 »	3,20 cc »	3,90 cc »	4,20 cc »
24 »	4,15 cc »	4,30 cc »	4,95 cc »
48 »	4,90 cc »	5,80 cc »	5,55 cc »
72 »	6,70 cc »	6,85 cc »	9,70 cc »
96 »	6,70 cc »	7,55 cc »	9,95 cc »
120 »	6,60 cc »	8,60 cc »	10,20 cc »

d'où il résulte qu'en l'absence de tout sel minéral :

1° L'hydrolyse passe par un maximum aux environs de 72 h. de contact pour subir après une lente rétrogradation ;

2° En présence de Mn SO^4 la lipase est activée et après 120 h. de contact le maximum de l'hydrolyse n'est pas encore atteint ;

3° Ce même phénomène se reproduit en présence du phosphate qui active la lipase beaucoup plus que ne le fait le sulfate de manganèse.

Nous remarquons que le même sel minéral (SO^4 Mn ou phosphate bipotassique) en présence de la même lipase du coton se conduit d'une manière différente suivant l'huile employée : une hydrolyse maxima suivie d'une rétrogradation est produite après un contact de 120 heures entre les sels minéraux la lipase et l'huile d'olive, tandis que, dans les mêmes conditions, en présence d'une huile de coton, le maximum d'hydrolyse n'est pas atteint après la même durée de contact.

En étudiant l'action de la lipase du coton sur une huile de *sinapis sinensis* obtenue aussi par pression, nous voyons qu'après un contact de 18 heures à 32° C :

l'acidité en présence de SO^4 Mn devient : 6,10 cc NaOH N ;

biphosphate K : 7.25 cc »

sans sel minéral : 7.65 cc »

(témoin titré de suite 3 cc NaOH N)

ce qui montre qu'ici les 2 sels minéraux, différant entre eux gênent l'hydrolyse de cette huile.

Après avoir étudié l'action de cette lipase sur des huiles non siccatives et mi-siccatives j'ai voulu voir comment elle se conduit en présence d'*huiles siccatives*.

§ III. J'ai fait agir la lipase du coton sur une *huile de lin* obtenue par pression (elle m'avait servi dans mes expériences avec les graines de ricin) et sur une *huile de tournesol*.

Il me fut impossible de me procurer une huile de tournesol obtenue par pression. J'ai donc extrait l'huile de graines de tournesol au moyen du même CCl^4 qui m'avait servi dans mes recherches sur la lipase de graines de ricin.

Différant en cela des huiles d'olive et de coton dont l'hydrolyse est activée par le phosphate bipotassique, l'huile de tournesol montre le phénomène contraire,

Huile de Tournesol et lipase du coton : témoin 3,50 cc NaOH N :

Température	Durée	Phosphate bipotassique	Acidité produite
32° C	3 heures	sans	6,95 cc NaOH N
		avec	5,70 cc »
32° C	18 heures	sans	7,85 cc »
		avec	7,60 cc »
32° C	48 heures	sans	9,65 cc »
		avec	8,15 cc »

tandis que l'*huile d'olive* et l'*huile de coton* donnaient :

Température	Durée	Phosphate bipotassique	avec huile d'olive	avec huile de coton
32° C	3 h.	sans	5,60 cc NaOH N	2,70 cc NaOH N
		avec	6,10 cc »	3,20 cc »
32° C	18 h.	sans	6,10 cc »	3,20 cc »
		avec	6,75 cc »	4,90 cc »
32° C	48 h.	sans	6,90 cc »	4,90 cc »
		avec	6,95 cc »	5,85 cc »

Toutefois, comme ces deux huiles étaient obtenues par pression et comme l'huile de tournesol avait été extraite au moyen de CCl^4 le résultat obtenu avec cette dernière huile en présence du phosphate pouvait être due à une action du CCl^4.

Ne pouvant opérer sur de l'huile de tournesol de pression, j'ai tourné la difficulté en expérimentant sur des huiles de lin et d'olive d'extraction.

a) J'ai donc extrait l'huile des graines de lin au moyen du CCl^4, et sur cette huile j'ai fait agir la lipase du coton à 32° C suivant le tableau :

Température 32° C (CCl^4)	Durée 3 h.	Durée 18 h.
Sans phosphate bipotassique.	5,20 cc NaOH N	6,85 cc NaOH N
Avec » » .	5,95 cc »	7,15 cc »
Avec Mn SO^4	5,60 cc »	6,55 cc »

Il en résulte que cette huile de *lin siccative*, extraite par CCl^4 est plus hydrolysée en présence de la lipase du coton par le phosphate bipotassique qu'en l'absence de celui-ci, tandis que SO^4Mn gêne. Donc la présence du CCl^4 a été sans effet, et le résultat a été le même qu'avec l'huile de pression.

b) D'autre part, des graines de coton indochinoises, traitées également par CCl^4 ont donné une huile dans laquelle la lipase du coton a produit une acidité indiquée dans le tableau suivant :

Huile de coton (par CCl^4) + *lipase du coton* ;

Témoin 7 cc NaOH N

Température	Phosphate bipotassique	Durée de l'expérience		
		3 heures	18 heures	42 heures
32° C	sans	10,00 cc NaOH N	8,60 cc NaOH N	9,20 cc NaOH N
32° C	avec	10,65 cc »	9,30 cc »	9,95 cc »

Ces chiffres montrent donc l'influence encore activante du phosphate sur cette *huile mi-siccative* extraite par CCl^4, et nous avons, en même temps, la preuve que le solvant n'a pas eu précédemment d'influence sur le résultat constaté avec l'huile de Tournesol.

Au reste, si nous faisons maintenant agir sur une autre huile *mi-siccative, l'huile de sésame*, la lipase du coton, en présence de SO^4Mn et du phosphate bipotassique, nous remarquons que, tout comme avec l'huile de Tournesol, le phosphate bipotassique gêne l'hydrolyse tandis que $MnSO^4$ l'active un peu.

L'huile de sésame ainsi obtenue par dissolvant était une huile jaune claire.

J'ai fait agir la lipase du coton, pendant 18 heures à 32° C, en présence de phosphate bipotassique et dans une autre expérience, en présence de SO^4Mn.

Témoin : 4 cc NaOH N

avec $MnSO^4$ ..	l'acidité produite est neutralisée par :		6,65 cc	NaOH N
sans Sel Minéral..	»	»	6,35 cc	»
avec Phosph.-Bipot.	»	»	6,10 cc	»

d'où résulte clairement que seul ici le sulfate de manganèse favorise l'hydrolyse.

c) Enfin j'ai fait agir la lipase du coton en présence de phosphate bipotassique ou de sel de manganèse sur deux huiles légèrement siccatives :

Une *huile de Kapok*, rentrant comme l'huile de coton, dans le groupe des huiles de Malvacées, mais un peu plus siccative que cette huile de coton ;

Une *huile de Niger* rentrant dans le groupe des huiles de composées et légèrement siccative aussi.

Au moyen de CCl^4, j'ai extrait de ces deux espèces de graines deux huiles que j'ai hydrolysées par la lipase du coton. Cette

hydrolyse a été favorisée par le phosphate bipotassique et gênée par le SO^4 Mn, ainsi que le montrent les tableaux suivants :

Temp.	Durée	Huile de Kapok (CCl^4) témoin 3,70 cc NaOH N	Huile de Niger (CCl^4) témoin 3,90 cc NaOH N
32° C	18 h.	avec Mn SO^4 6,90 cc NaOH N	5,30 cc NaOH N
32° C	18 h.	sans sel minéral 8,20 cc »	6,10 cc »
32° C	18 h.	avec phosph. bipot. 9,35 cc »	6,65 cc »

Pour montrer qu'en l'absence des 7 cc d'huile ajoutés, les graines de coton qui sont oléagineuses ne produisent qu'une très faible acidité quand on les abandonne à elles-mêmes à 32° même pendant 18 heures, j'ai refait sur ces graines les expériences d'*Autolyse* déjà faites avec les graines de ricin.

Donc 5 gr. de graines de coton broyées, 7 cc de glycérine pure (pour lesquels il me paraît inutile de mentionner à nouveau ici, les critiques et leur réfutation) et 4 cc de CH^3 COOH à 2,5 % furent mises dans des fioles, et les expériences furent faites comme précédemment.

Témoin : 2,35 cc NaOH N

Après les avoir laissé :

3 h. à 32° C { sans Mn SO^4 l'acidité devient : 3,50 cc NaOH N ; avec » » » 3,60 cc »

18 h. à 16° C sans Mn SO^4 » » 3,20 cc »

tandis que :

après 3 h. à 16° C { sans Mn SO^4 l'acidité devient : 3,45 cc NaOH N ; avec » » » 3,35 cc »

Comme une *ébullition dans l'eau* pendant 1 heure détruit complètement la diastase, nous pouvons admettre que l'acidité

trouvée en laissant en contact différentes huiles et cette lipase du coton a bien été provoquée par l'hydrolyse des 7 cc d'huile ajoutés au moyen de cette lipase.

CONCLUSIONS

Il résulte des expériences précédentes que dans :

1° les graines de coton *non germées* il n'y a pas de lipase active pouvant hydrolyser les huiles ;

2° Dans les *graines germées* une lipase active manifeste sa présence par l'acidité plus grande des huiles avec lesquelles on la met en contact quand la germination n'a duré que quelques jours. A mesure que celle-ci se prolonge, la lipase s'affaiblit de plus en plus. Quand les premières feuilles apparaissent sur la petite plante de coton, la lipase a disparu.

La lipase du coton produit l'hydrolyse des huiles siccatives, mi-siccatives et non siccatives, mais dans cette action, nous avons remarqué quelques différences selon les huiles hydrolysées.

§ 1er. — S'il s'agit d'une huile *non siccative*, comme l'huile d'olive, nous voyons qu'en l'absence de sel minéral, l'hydrolyse maxima est obtenue après 72 h. de contact entre l'huile et la lipase contenue dans les graines germées, puis il y a une rétrogradation. En présence de $MnSO^4$ et du phosphate bipotassique nous obtenons les mêmes résultats.

§ II. — Avec une huile *mi-siccative* comme l'huile de coton, en l'absence de tout sel minéral le maximum d'hydrolyse est atteint après 72 h. de contact, puis comme dans le cas précédent, une rétrogradation se produit. Par contre, en présence des sels minéraux SO^4Mn et phosphate bipotassique qui acti-

vent fortement la lipase, le maximum d'acidité n'est pas encore obtenu même après 120 h. de contact.

Nous voyons que sur l'huile d'olive et sur l'huile de coton obtenues toutes deux par pression, les 2 sels minéraux ont une influence différente. Le sulfate de manganèse gêne l'hydrolyse de l'huile d'olive et favorise celle de l'huile de coton.

Le phosphate bipotassique favorise au contraire les deux hydrolyses de ces deux huiles.

Sur l'huile de Sinapis Sinensis, autre huile demi-siccative, les 2 sels minéraux gênent.

§ III. — En présence d'*huiles siccatives,* des phénomènes analogues vont se produire.

Le phosphate bipotassique gêne fortement l'hydrolyse de l'huile de Tournesol. Comme celle-ci avait été extraite par CCl^4, on aurait pu attribuer à ce dissolvant la gêne provoquée par le phosphate.

Mais j'ai extrait de l'*huile de lin au moyen de* CCl^4 et sur l'hydrolyse de cette huile, mise en contact avec la lipase du coton le phosphate bipotassique a été favorable de façon analogue. Avec une huile de *lin de pression* le $Mn\,SO^4$ a plutôt gêné, comparativement au phosphate-bipotassique.

Après 18 h. de contact à 32° C, l'acidité devient :

en l'absence de sel minéral	: 5,00 cc	NaOH N
en présence de $Mn\,SO^4$	: 3,75	»
en présence de phosphate	: 5,65	»

Ces résultats nous engageaient à examiner au même point de vue un certain nombre d'huiles pour établir sur ces diverses huiles l'influence *à priori* variable du sulfate de manganèse et du phosphate-bipotassique.

Et nous avons constaté que :

Le phosphate bipotassique :

gêne	l'hydrolyse des huiles	Sinapis Sinensis (pression)
	» »	Sésame (CCl^4)
	» »	Tournesol (CCl^4)
favorise	l'hydrolyse des huiles	Coton (pression)
	» »	Coton (CCl^4)
	» »	Lin (pression)
	» »	Lin (CCl^4)
	» »	Kapok (CCl^4)
	» »	Niger (CCl^4)
	» »	Olive (pression)

SO^4 Mn :

gêne	l'hydrolyse des huiles	Sinapis Sinensis (pression)
	» »	Niger (CCl^4)
	» »	Kapok (CCl^4)
	» »	Lin (CCl^4)
	» »	Lin (pression)
favorise	l'hydrolyse des huiles	Sésame (CCl^4)
	» »	Olive (pression)

En même temps, nous constatons cet autre fait intéressant que le SO^4 Mn qui, antérieurement favorise l'hydrolyse des huiles de lin obtenues par pression ou extraction (CCl^4) en présence de la lipase des ricins, gêne, au contraire, l'hydrolyse de ces mêmes huiles en présence de la lipase du coton.

Les phénomènes d'autolyse et d'ébullition de la graine de coton ont montré que l'augmentation de l'acidité provient de l'existence d'une lipase dans le coton.

La conclusion émise à propos des graines de ricin, que pour avoir son maximum d'effet hydrolysant sur une huile donnée, toute lipase a besoin d'un sel minéral spécial à chaque cas, se trouve donc confirmée par mes expériences sur la lipase du coton.

Le résumé précédent montre que la même huile en présence de la même lipase, toutes conditions étant égales, est plus ou moins hydrolysée suivant le sel minéral ajouté, celui-ci pouvant gêner ou favoriser les réactions lipolytiques.

Des différences de cet ordre pourraient peut-être expliquer pourquoi de vieilles graines de ricin ont peu d'action sur une huile de soja extraite par CCl^4. Il est probable qu'un sel minéral encore à trouver était ici nécessaire pour exciter l'action de la vieille lipase.

En comparant la lipase contenue dans les graines de coton égyptien et celle existant dans les graines de ricin nous avons constaté :

1° Le grand pouvoir lipolytique des graines de ricin à l'état de vie ralentie tandis que les graines de coton sont dénuées de ce pouvoir si elles n'ont pas germé.

2° Dans les mêmes conditions expérimentales et sur les mêmes huiles, en présence des mêmes sels minéraux les différents ricins produisent une hydrolyse 4 à 5 fois plus forte que les graines de coton.

3° Le même sel minéral (SO^4 Mn) sur les mêmes huiles de lin (pression ou extraction), a une action différente suivant qu'on se sert de la lipase du ricin ou de celle du coton.

Ces faits et les conclusions qui en découlent nous autorisent donc à admettre :

1° Que l'influence d'un sel minéral sur une hydrolyse varie suivant l'huile et la lipase employées ;

2° Que chaque huile a besoin d'un sel minéral spécial pour pouvoir être hydrolysée au maximum par une lipase donnée ;

3° Que, à en juger par leurs modes respectifs d'actions dans les conditions que nous avons plus haut précisées, la lipase des graines de coton est différente de la lipase des graines de ricin.

Tableau I. — Huile d'olive

Tempre	Mn SO4	Durée	R. Sanguin du B. 1921 témoin 7,3 cc	Gros ricin blanc mouch. du B. 1921 témoin 7 cc	Gros ricin marbré du Brésil 1921 témoin 6 cc.
16°	sans	30 m	18,60	18,50	20,40
		1 h.	24,50	23,85	27,40
		2 h.	26,65	26,80	28,60
	avec	30 m	17,95	21,60	22,60
		1 h.	22.10	23,10	24,50
		2 h.	25,05	27,45	—
32°	sans	30 m	24,90	25,50	25,90
		1 h.	26,20	27,75	27,25
		2 h.	27,70	28,25	27,70
	avec	30 m	24.00	22,90	25,10
		1 h.	25,80	24,05	27,40
		2 h.	26,90	28,95	27,65
40°	sans	30 m	24,50	28,10	25,90
		1 h.	25.00	27,00	27,80
		2 h.	27,10	26,80	28,30
	avec	30 m	26,80	27,80	25,90
		1 h.	26,30	27,15	27,35
		2 h.	26,30	25,60	27,80

Tableau II. — Avec Ricin sanguin 1921.

Temp.	Mn SO4	Durée	Huile d'Olive témoin 7,3 cc	Huile de Lin témoin 3,9 cc
16° C	sans	30 m	18,60	14,30
		2 h.	26,65	19,00
	avec	30 m	17,95	14,80
		2 h.	25,05	24,10
32° C	sans	30 m	24,90	23,40
		2 h.	27,70	25,55
	avec	30 m	24,00	24,15
		2 h.	26,90	26,90
40° C	sans	30 m	24,50	21,65
		2 h.	27,10	24,80
	avec	30 m	26,80	23,45
		2 h.	26,30	26,75

TABLEAU III. — Gros Ricin marbré 1921.

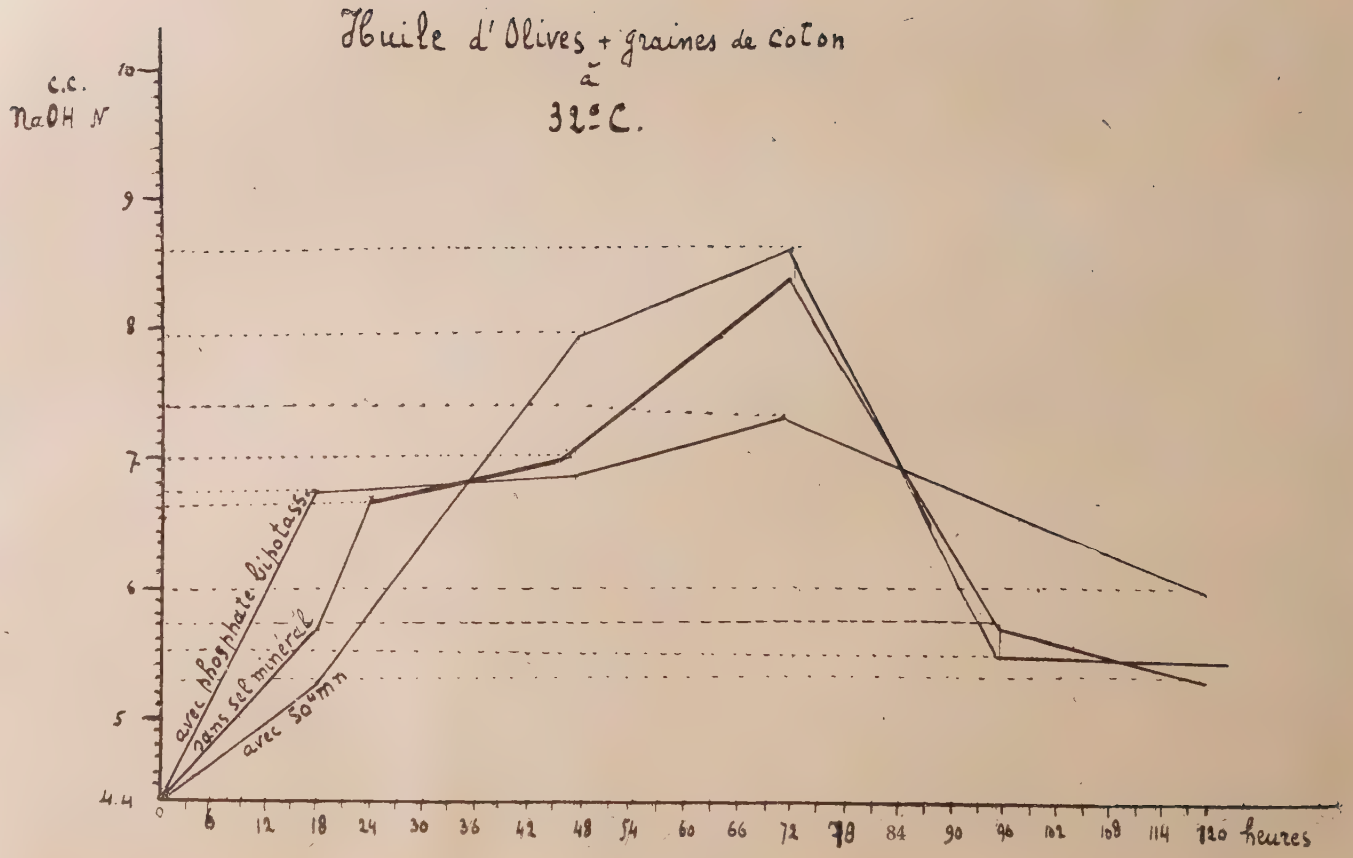
Temp.	Mn SO4	Durée	Huile de Ricin médicinale
16° C	sans	2 heures	26,50
	avec	2 heures	26,45
32° C	sans	2 heures	32,30
	avec	2 heures	30,40

TABLEAU IV. — Ricin Minor 1904.

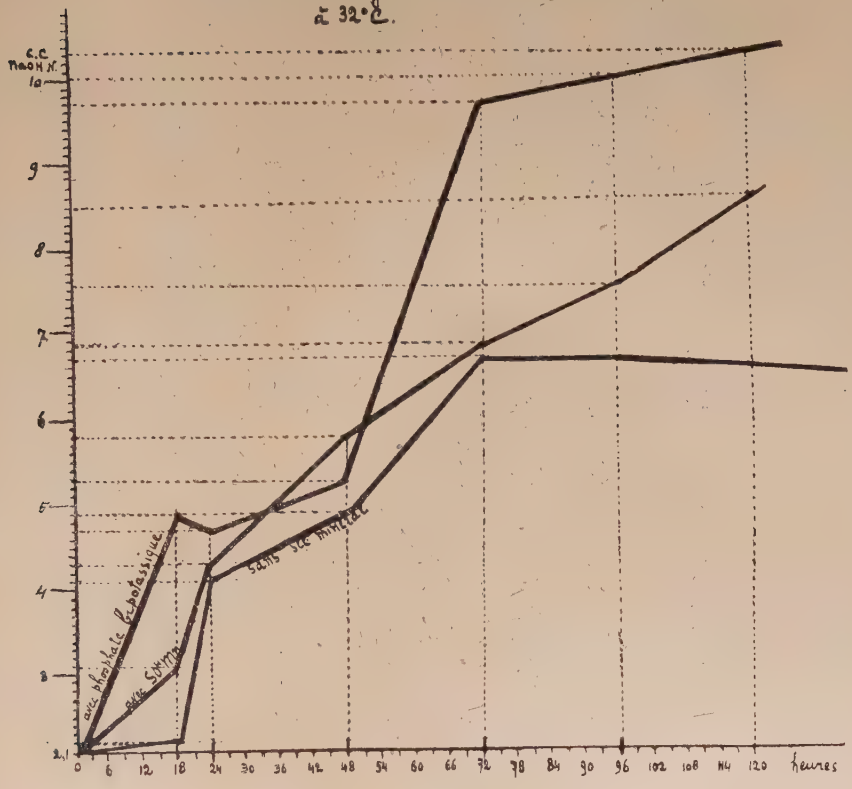
Temp.	Mn SO4	Durée	Huile Olive témoin 3,6 cc	H. Soja brute témoin 4,2 cc	Huile Lin témoin 3,9 cc
16° C	sans	30 m	12,30	17,10	11,45
		2 h.	22,60	25,45	23,80
	avec	30 m	12,50	16,20	12,60
		2 h.	24,00	24,05	24,90
32° C	sans	30 m	19,45	17,60	18,90
		2 h.	23,60	27,90	26,80
	avec	30 m	19,55	18,10	15,90
		2 h.	26,40	26,95	22,50
40° C	sans	30 m	18,60	16,10	13,10
		2 h.	21,90	17,55	17,45
	avec	30 m	18,00	19,60	17,15
		2 h.	18,50	21,50	17,75

TABLEAU V. — Ricin sanguin 1921.

Temp.	Mn SO4	Durée	huile d'olive	huile de lin	huile de soja
16° C	sans	30 m	18 60	14,30	11,60
		2 h.	26,65	19,00	21,60
	avec	30 m	17,95	14,80	11,55
		2 h.	25,05	24,10	21,75
32° C	sans	30 m	24,90	23,40	21,90
		2 h.	27,70	25,55	28,95
	avec	30 m	24,00	24,15	20,85
		2 h.	26,90	26,90	28,70
40° C	sans	30 m	24,50	21,65	13,40
		2 h.	27,10	24,80	16,80
	avec	30 m	26,80	23,45	16,90
		2 h.	26,30	26,75	20,40


Huile d'Olives + graines de coton
à
32° C.
c.c.
NaOH N
10
9
8
7
6
5
4.4
0
6
12
18
24
30
36
42
48
54
60
66
72
78
84
90
96
102
108
114
120
heures
avec phosphate bipotassique
sans sel minéral
avec solution

Huile de coton + graines de coton
à 32°C.



DEUXIÈME THÈSE

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

La Réversibilité dans les Actions Diastasiques.

Vu et Approuvé :
Marseille, le 29 Juillet 1922.
Le Doyen de la Faculté des Sciences,
Signé : RIVALS.

Vu et Permis d'Imprimer :
Pour le Recteur de l'Académie,
Le Doyen-Délégué,
Signé : MOREAU.

IMP. FERRAN JEUNE. — MARSEILLE